

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

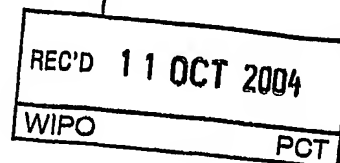


ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ
ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 123995
Телефон 240 60 15. Телекс 114818 ПДЧ. Факс 243 33 37

Наш № 20/12-588

EP/04/8373



“15” сентября 2004 г.

СПРАВКА

Федеральный институт промышленной собственности (далее – Институт) настоящим удостоверяет, что приложенные материалы являются точным воспроизведением первоначального описания, формулы, реферата и чертежей (если имеются) заявки № 2003123744 на выдачу патента на изобретение, поданной в Институт в июле месяце 28 дня 2003 года (28.07.2003).

Название изобретения:

Способ комплексной переработки бурых водорослей с получением препаратов для медицины и косметологии

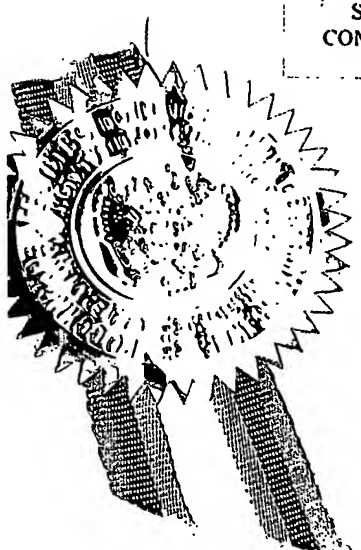
Заявитель:

ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ РАН

Действительные авторы:

ШЕВЧЕНКО Наталья Михайловна
ИМБС Татьяна Игоревна
УРВАНЦЕВА Анжела Михайловна
КУСАЙКИН Михаил Игоревич
КОРНИЕНКО Владимир Геннадьевич
ЗВЯГИНЦЕВА Татьяна Николаевна
ЕЛЯКОВА Людмила Алексеевна

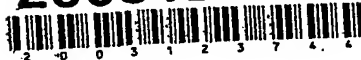
**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Заведующий отделом 20

А.Л. Журавлев

2003123744



МПК⁷ 35/80

**Способ комплексной переработки бурых водорослей
с получением препаратов для медицины и косметологии**

Изобретение относится к технологии комплексной переработки бурых водорослей с одновременным получением индивидуальных препаратов кислых и нейтральных полисахаридов, которые могут найти применение в медицине, а также с получением комплекса низкомолекулярных биологически активных соединений, который может найти применение в парфюмерно-косметической промышленности.

Известен способ получения биологически активных водорастворимых полисахаридов бурых водорослей, а именно ламинарана и фукоидана, предусматривающий использование хроматографического разделения этих полисахаридов на политетрафторэтилене (RU 2135518 C1, 27.08.1999).

Однако этот способ не является способом комплексной переработки бурых водорослей. Такие полисахариды, как водорастворимый полиманнуронат и щелочерастворимые альгинаты не извлекают этим способом из водорослей.

Известен способ комплексной переработки бурых водорослей семейства ламинариевых, в котором путем многократной обработки их экстрагирующими растворами, осаждением кристаллизацией и фильтрованием получают маннит, альгиновую кислоту, альгинат кальция, натрия, калия, аммония, смешанные водорастворимые соли альгиновой кислоты, обладающие высокой загущающей способностью, а также кормовую добавку из водорослевых отходов (RU 2070808, C1, 27.12.1996).

Однако, при производстве альгинатов этим способом, биологически активные водорастворимые полисахариды бурых водорослей попадают в отходы.

Известен способ переработки бурых водорослей, а именно ламинарии и фукуса пузырчатого с получением липидного и водорастворимого концентратов (RU 2132622 C1, 10.07.1999). Порошок, полученный из водорастворимых веществ экстракта бурых водорослей, представляет собой комплекс полисахаридов, маннита, витаминов, минеральных веществ. Выделение индивидуальных полисахаридов таких, как фукоидан, ламинаран, полиманнуронат, альгинаты, этот способ не предусматривает.

Известен способ получения биологически активных веществ из беломорской ламинарии, в соответствии с которым после осаждения полисахаридно-белкового комплекса из спиртового раствора осаждают комплекс ламинарана с фукоиданом, с последующим разделением его на индивидуальные вещества (RU 2028153 C1, 09.02.1995).

Однако, как указал сам Заявитель этого способа, ряд недостатков, присущих технологии переработки водоросли, а также получение полисахаридно-белкового комплекса, ламинарана и фукоидана, обладающих одним видом биологического действия (слабительный эффект), привели его к созданию другого способа получения биологически активных веществ из ламинарии для медицинских целей (RU 2194525 C1, 20.12.2002). Способ заключается в том, что сырье высушивают, измельчают, обезжиривают хлороформом, последовательно экстрагируют этанолом, горячей водой и карбонатом натрия. В результате из водоросли одного вида, а именно беломорской водоросли ламинарии сахаристой получают три продукта: маннит, суммарный полисахаридно-белковый комплекс и альгинат натрия.

К недостаткам этого способа можно отнести следующие: сушка водоросли с последующим обезжириванием ее хлороформом приводит к удалению ценного липидного комплекса, из спиртового экстракта получают только маннит, остальные низкомолекулярные соединения водорослей попадают в отходы. Получаемый полисахаридно-белковый комплекс «Ламинарид СБ» обладает узким спектром биологического действия, а именно детоксицирующим и слабительным действием.

Способ не позволяет получать индивидуальные биологически активные полисахариды такие, как ламинаран, фукоидан, полиманнуронат.

Известно, что полисахариды бурых водорослей обладают различными биологически активными свойствами, и это обуславливает перспективность использования препаратов из водорослей в медицине. У фукоиданов обнаружены антикоагулянтная, противоопухолевая, гиполипидемическая, антивирусная (в том числе против ВИЧ-инфекции) активности (Nagumo T., Nishino T. Fucan Sulfates and Their Anticoagulant Activities // In: Polysaccharides in Medicinal Applications. (Ed. S. Dumitriu). University of Sherbrooke, Quebec, Canada. N. -York-Basel-Hong Kong. 1996. P. 545-57; Zhuang C., Itoh H., Mizuno T., Ito H. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, *Ulmatoranoo* (*Sargassum thunbergii*) // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1995. Vol. 59. P. 563-567; Beress A., Wassermann O., Bruhn T. et al. A New Procedure for the Isolation of Anti-HIV Compounds (Polysaccharides and Polyphenols) from the Marine Alga *Fucus Vesiculosus* // Natural Products-Lloydia. 1993. V.56. 4. - P. 478-488).

Ламинаран обладает противоопухолевым действием (Remedium-Журнал о российском рынке лекарств, 1992, №4 с.49).

Полиманнуронат обладает противоопухолевым и гиполипидемическим действием (Ж. Биология моря 2001, Т 27, №3, с.151-162).

Заявителю на настоящий момент не известны способы комплексной переработки бурых водорослей с получением индивидуальных препаратов фукоидана, ламинарана, полиманнуроната, альгинатов со стандартными характеристиками. Известными способами и, в частности, способом, наиболее близким к заявляемому (RU 2194525 C1, 20.12.2002), получают, в основном, не индивидуальные препараты, а комплексы полисахаридов. Однако, физиологическое действие на организм полисахаридов, входящих в комплексы, различное (Ю.С. Хотимченко, В.В. Ковалев, О.В. Савченко, О.А. Зиганшина. Физико-химические свойства, физиологическая активность и применение

альгинатов-полисахаридов бурых водорослей. Ж. Биология моря 2001, Т 27, №3, с.151-162). Поэтому применение полисахаридов водорослей как терапевтических агентов сдерживается проблемами получения продуктов со стандартными характеристиками.

Исходя из вышеизложенного, представляется актуальной задача разработки способа комплексной переработки бурых водорослей с получением индивидуальных препаратов кислых и нейтральных полисахаридов со стандартными характеристиками, которые могут найти применение в медицине, а также концентрата низкомолекулярных биологически активных веществ, который может найти применение в парфюмерно-косметической промышленности

Поставленная задача решена способом комплексной переработки бурых водорослей, который заключается в следующем:

- а) водоросль обрабатывают этанолом, экстракт отделяют, этанол отгоняют и получают концентрат биологически активных низкомолекулярных соединений;
- б) обработанную водоросль экстрагируют раствором разбавленной соляной кислоты при pH 2,0-2,5, экстракт концентрируют на ультрафильтрационной установке, нейтрализуют, упаривают и получают концентрат, содержащий полисахарид-1, представляющий смесь ламинарана и фукоидана;
- в) концентрат нейтрализуют и последовательно осаждают этанолом фукоидан (F1), затем ламинаран (L1), осадки промывают этанолом и высушивают;
- г) обработанную водоросль дважды экстрагируют горячей водой при pH 3,5-5,0;
- д) экстракты объединяют и концентрируют на ультрафильтрационной установке, концентрат упаривают и получают полисахарид-2, представляющий смесь ламинарана, фукоидана и полиманнуровой кислоты;
- е) доводят pH концентрата до значения 2,0-2,5, отделяют осадок полиманнуровой кислоты центрифугированием;

ж) осадок растворяют в щелочном растворе и осаждают этанолом соль полиманнуроновой кислоты (М), осадок промывают этанолом и высушивают;

з) супернатант нейтрализуют и этанолом осаждают последовательно фукоидан (F2) и ламинаран (L2), осадки промывают этанолом и высушивают;

и) остаток водоросли подвергают щелочной обработке при pH 8-9, экстракт концентрируют на ультрафильтрационной установке и осаждают этанолом полисахарид-3, представляющий соль альгиновой кислоты (А), осадок промывают этанолом и высушивают.

Предлагаемый новый способ разработан для комплексной переработки дальневосточных видов бурых водорослей таких, как *Laminaria cichorioides* и/или *Laminaria japonica*, и/или *Alaria marginata*, и/или *Alaria fistulosa*, и/или *Fucus evanescens*, и/или *Undaria pinnatifida*. Однако способ является универсальным, он может быть применен и к другим видам водорослей, как дальневосточным, так и любым другим бурым водорослям. Но в каждом конкретном случае будет получен определенный набор кислых и нейтральных полисахаридов, отличающихся выходами, структурными характеристиками, моносахаридным составом.

Способ предусматривает использование свежей или замороженной водоросли, т.к. при сушке водоросли полифенолы и каротиноиды легко окисляются. При этом не надо вводить стадию измельчения водоросли, поскольку после глубокого замораживания с последующим размораживанием клеточные вещества целого таллома водоросли более полно извлекаются экстрагентами.

В соответствии с предлагаемым способом свежую или замороженную водоросль после удаления мелких раковин и механических примесей заливают этанолом и выдерживают в течение 20 - 24 ч при температуре 40-60⁰С, этанольный экстракт сливают, этанол отгоняют и получают этанольный концентрат биологически активных низкомолекулярных соединений. Концентрат богат полифенолами, маннитом,

каротиноидами, аминокислотами, йодом, минеральными солями, витаминами группы В и может найти применение в парфюмерно-косметической промышленности.

Обработанную водоросль высушивают, заливают разбавленным раствором соляной кислоты и экстрагируют 10-14 ч при 20-25⁰С при перемешивании. Экстракт концентрируют на ультрафильтрационной установке с мембраной, имеющей поры 5кДа, нейтрализуют до pH 6,0 раствором гидроксида натрия и упаривают. Получают концентрат- полисахарид-1, представляющий смесь ламинарана и фукоидана. Концентрат нейтрализуют и осаждают двумя объемами этанола фукоидан (F1), осадок промывают 96% этанолом и высушивают. Получают препарат фукоидана. Далее из раствора осаждают ламинаран (L1) добавлением еще двух объемов этанола, осадок промывают 96% этанолом и высушивают. Получают препарат ламинарана.

Затем водоросль последовательно дважды экстрагируют горячей водой при pH 3,5-4,0 при перемешивании в течение 2-4 ч и 1-2 ч соответственно. Экстракты объединяют, концентрируют на ультрафильтрационной установке с мембраной, имеющей поры 15кДа, концентрат упаривают. Получают полисахарид-2, представляющий смесь ламинарана, фукоидана и полиманнуроновой кислоты. Затем доводят pH экстракта до значения 2,0-2,5, отделяют осадок полиманнуроновой кислоты центрифугированием. С целью получения соли полиманнуроновой кислоты осадок растворяют в минимальном объеме гидроксида натрия или оксалата аммония, или гидроксида кальция, или гидроксида магния, затем раствор нейтрализуют и осаждают соль полиманнуроновой кислоты (М) добавлением двух объемов этанола, осадок промывают 96% этанолом и высушивают. Получают препарат полиманнуроната.

Супернатант, образовавшийся после осаждения полиманнуроновой кислоты, нейтрализуют и осаждают фукоидан (F2) добавлением двух объемов этанола, осадок промывают 96% этанолом и высушивают. Получают препарат фукоидана. Добавлением

ещё двух объемов этанола осаждают ламинаран (L2), осадок промывают 96% этанолом и высушивают. Получают препарат ламинарана.

С целью получения соли альгиновой кислоты остаток водоросли подвергают щелочной обработке раствором гидроксида натрия или оксалата аммония, или гидроксида кальция, или гидроксида магния при pH 8-9 в течение 2-4 ч при температуре 55-65⁰С, экстракт концентрируют на ультрафильтрационной установке с мембраной, имеющей поры 100 кДа, нейтрализуют и осаждают этанолом полисахарид-3, представляющий соль альгиновой кислоты (А). Осадок промывают 96% этанолом и высушивают. Получают препарат альгината.

Технический результат заявляемого способа заключается в том, что он позволяет комплексно переработать бурые водоросли и получить полный набор индивидуальных полисахаридов со стандартными характеристиками. Получаемые препараты кислых и нейтральных полисахаридов могут найти применение в медицине в качестве терапевтических агентов. Стандартные характеристики этих препаратов представлены в примерах конкретного выполнения заявляемого способа.

Предлагаемый способ позволяет получить также концентрат, богатый биологически активными низкомолекулярными соединениями, который может найти применение в парфюмерно-косметической промышленности.

Остаток водоросли после получения концентрата и препаратов полисахаридов можно использовать как кормовую добавку.

Заявляемый способ характеризуется простотой и технологичностью, т.к. включает, в основном, экстракцию, ультрафильтрацию и дробное высаживание целевых продуктов. С помощью последнего приема удастся быстро разделить полисахариды-1 и 2 на индивидуальные препараты: фукоидан, ламинаран и полиманнуроновую кислоту, и в зависимости от вида водоросли получить те или иные продукты с хорошими выходами.

Этанол отгоняется и используется повторно. Для ультрафильтрации и диализа используются высокоэффективные полые волокна.

В таблице 1 представлены состав и выход полисахаридов –1,2,3, полученных предлагаемым способом из разных видов водорослей порядка ламинариевых и порядка фукусовых.

Таблица 1

Название водоросли	Выход полисахарида, % от веса сухой водоросли					
	Полисахарид-1		Полисахарид-2			Полисахарид-3
	L ^{I*}	F ^{I**}	L ²	F ²	M ^{***}	A ^{****}
<i>Fucus evanescens</i>	0,5-0,6	3,4-4,0	0,3-0,5	7,0-7,8	0,2-0,3	14,0-14,5
<i>Laminaria cichorioides</i>	4,1-5,0	2,0-2,5	6,0-6,5	5,0-5,5	0-0,1	18,0-19,0
<i>Laminaria japonica</i>	0,3-0,5	2,1-3,0	0,7-1,0	2,7-3,0	0,2-0,3	22,0-23,0
<i>Alaria marginata</i>	0-0,1	0,5-1,0	0,2-0,3	0,7-1,0	11,0-11,5	21,0-22,1
<i>Alaria fistulosa</i>	0,2-0,4	1,5-2,0	0,3-0,5	0	21,5-22,1	14,5-15,0
<i>Undaria pinnatifida</i>	0	3,0-3,5	0	6,0-7,0	2,0-3,0	15,0-16,0

L^{*} - ламинаран, F^{**} - фукоидан, M^{***} - полиманнуронат, A^{****} - альгинат

Полученные заявляемым способом препараты кислых и нейтральных полисахаридов были подвергнуты качественному и количественному анализу с помощью следующих методов:

1. Фенол-сернокислотный-- для определения содержания общих сахаров (Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., et al. Colorimetric method for determination of sugars and related

2. Моносахаридный состав (нейтральные сахара) определен высокоэффективной жидкостной хроматографией. Образцы полисахаридов (5мг) подвергали гидролизу 4 N HCl при 100°C (2 ч). Моносахаридный состав продуктов кислотного гидролиза определяли методом ВЭЖХ на углеводном анализаторе IC-5000 Biotronik (смола Durrum DA-X8-11, колонка 385x3,2мм, 60°C), обнаружение проводили бицинхонинатным методом; интегрирующая система Shimadzu C - R2 AX). Моносахариды (Rha Rib, Man, Fuc, Gal, Xyl, Glc) использовали как стандарты для ВЭЖХ (Waffenschmidt S., Jaenicke L. Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2'-bicinchoninate.//Anal. Biochem. 1987. Vol. 165. P. 337-340).

3. ^{13}C -ЯМР спектры были получены при 60°C на ЯМР-спектрометре Bruker-Physic WM-250 с рабочей частотой 62,9 МГц в D₂O при температуре 70°C. Образцы полисахаридов растворяли в D₂O и диметилсульфоксиде.

Сущность способа поясняется следующими примерами конкретного выполнения:

Пример 1. Свежую водоросль *Fucus evanescens* в количестве 25 кг после удаления мелких раковин и механических примесей помещают в экстрактор и заливают этанолом в соотношении 1/1-вес/объем. Выдерживают при температуре 50°C 22 ч. Этанольный экстракт сливают, этанол отгоняют на вакуумном циркуляционном выпарном аппарате (ВВА), получают концентрат биологически активных низкомолекулярных соединений.. Отгон этанола используют повторно.

Обработанную водоросль высушивают, заливают 0,1 М раствором соляной кислоты до образования «зеркала» и экстрагируют 12 ч при 20-25°C при перемешивании. Экстракт концентрируют до 1/5 первоначального объема на ультрафильтрационной установке с мембраной, имеющей поры 5 кДа, нейтрализуют до pH 6,0 раствором гидроксида натрия и упаривают на роторном испарителе (РИ) до 1 л. Получают концентрат - полисахарид-1, представляющий смесь ламинарана и фукоидана. Концентрат нейтрализуют и осаждают двумя объемами этанола фукоидан (F1). Осадок промывают

96% этанолом, высушивают. Полученный препарат фукоидана представляет порошок кремового цвета, хорошо растворимый в воде, диметилсульфоксиде; не растворим в спирте, ацетоне, гексане, серном эфире; содержание золы составляет 26,6%.

Из раствора осаждают ламинаран (L1) добавлением еще двух объемов этанола, осадок промывают 96% этанолом, высушивают. Полученный препарат ламинарана представляет собой порошок кремового цвета, хорошо растворимый в воде, диметилсульфоксиде; не растворим в спирте, ацетоне, гексане, серном эфире; содержание золы составляет 2,6%.

Затем водоросль последовательно дважды экстрагируют горячей водой при перемешивании в течение 3 ч и 1,5 ч соответственно при pH 3,5-4,0. Экстракты объединяют, концентрируют до 1/10 первоначального объема на ультрафильтрационной установке с мембраной, имеющей поры 15 кДа, и упаривают на РИ до объема 1 л. Получают концентрат-полисахарид-2, представляющий смесь ламинарана, фукоидана и полиманнуроновой кислоты. Доводят pH экстракта до значения 2,0-2,5 и отделяют осадок полиманнуроновой кислоты центрифугированием. Осадок растворяют в минимальном объеме 1М раствора гидроокиси натрия, нейтрализуют и осаждают полиманнуронат натрия (М) добавлением двух объемов этанола, промывают 96% этанолом, высушивают. Полученный препарат полиманнуроната натрия представляет собой порошок кремового цвета, хорошо растворимый в воде, диметилсульфоксиде; не растворим в спирте, ацетоне, гексане, серном эфире; содержание золы составляет 15,0%.

¹³C-ЯМР спектр полиманнуроната натрия представлен на фиг. 1.

Супернатант, образовавшийся после осаждения полиманнуроновой кислоты, нейтрализуют и осаждают фукоидан (F2) добавлением двух объемов этанола, осадок промывают 96% этанолом, высушивают. Полученный препарат фукоидана представляет порошок кремового цвета, хорошо растворимый в воде, диметилсульфоксиде, не растворим в спирте, ацетоне, гексане, серном эфире; содержание золы составляет 25,0%.

Добавлением ещё двух объемов этанола осаждают ламинаран (L2), осадок промывают 96% этанолом, высушивают. Полученный препарат ламинарана представляет порошок кремового цвета, хорошо растворимый в воде, диметилсульфоксиде; не растворим в спирте, ацетоне, гексане, серном эфире; содержание золы составляет 2,1%.

После этого остаток водоросли заливают 1% раствором гидрокарбоната натрия до образования «зеркала» и экстрагируют 3 ч при температуре 65°C. Экстракт концентрируют в 3,5 раза от первоначального объема на ультрафильтрационной установке с мембраной, имеющей поры 100 кДа, нейтрализуют и осаждают двумя объемами этанола полисахарид-3, представляющий альгинат натрия (А). Осадок промывают 96% этанолом и сушат. Полученный препарат альгината натрия представляет порошок коричневого цвета, хорошо растворимый в воде, диметилсульфоксиде; не растворим в спирте, ацетоне, гексане, серном эфире; содержание золы составляет 18,0%.

^{13}C -ЯМР спектр альгината натрия представлен на фиг. 2.

В таблице 2 представлены выход, моносахаридный состав и молекулярная масса полисахаридов из *Fucus evanescens*.

Таблица 2

Поли- сахарид	Выход		Моносахаридный состав (нейтральные сахара), %					Fuc/SO ₄ ²⁻ моль/моль	Мм, кДа
	граммы	%	ман- ноза	фукоза	галактоза	ксилоза	глюко- за		
L1	14,5	0,6	0	0	0	3	89		5-10
F1	73,0	3,4	1	74	11	6	4	1:(0,7-1)	20-500
L2	12,5	0,5	0	0	0	0	100		5-10
F2	177,0	7,1	4	82	4	3	0	1:(0,8-1)	15-500
M	7,5	0,3	0	0	0	0	0		30-40
A	360,0	14,4	0	0	0	0	0		150-500

Пример 2. Замороженную водоросль *Laminaria cichorioides* (25 кг) подготавливают к экстракции и экстрагируют этанолом так, как описано в примере 1.

Обработанную водоросль высушивают, заливают 0,1М раствором соляной кислоты до образования «зеркала» и экстрагируют 12 ч при 20-25⁰С при перемешивании.. Экстракт концентрируют до 1/5 первоначального объема на ультрафильтрационной установке с мембраной, имеющей поры 5 кДа, нейтрализуют до pH 6,0 раствором гидроксида натрия и упаривают на РИ до 1 л. Получают концентрат - полисахарид-1, представляющий смесь ламинарана и фукоидана. Концентрат нейтрализуют и осаждают двумя объемами этанола фукоидан (F1). Осадок промывают 96% этанолом, высушивают. Полученный препарат фукоидана представляет порошок кремового цвета, хорошо растворимый в воде, диметилсульфоксиде, не растворим в спирте, ацетоне, гексане, серном эфире; содержание золы составляет 21,0%.

Из супернатанта осаждают ламинаран (L1) добавлением ещё двух объемов этанола, осадок промывают 96% этанолом, высушивают. Полученный препарат ламинарана представляет порошок белого цвета, хорошо растворимый в воде, диметилсульфоксиде; не растворим в спирте, ацетоне, гексане, серном эфире; содержание золы составляет 2,2%.

Далее все последующие стадии проводят, как описано в примере 1, но щелочную обработку проводят 1% раствором оксалата аммония. Получают препарат альгината аммония, представляющий порошок кремового цвета, хорошо растворимый в воде диметилсульфоксиде; не растворим в спирте, ацетоне, гексане, серном эфире; содержание золы составляет 15,0%.

В таблице 3 представлены выход, моносахаридный состав и молекулярная масса полисахаридов из *Laminaria cichorioides*.

Таблица 3

Полисахарид	Выход		Моносахаридный состав (нейтральные сахара), %					Fuc/SO ₄ ²⁻ моль/моль	Мм, кДа
	граммы	%	манноза	фукоза	галактоза	ксилоза	глюкоза		
L1	102,0	4,1	0	0	0	0	97		5-10
F1	62,5	2,5	1	90	1	0	5	1:(1,6-1,8)	20-40
L2	152,1	6,1	0	0	0	0	100		5-10
F2	127,2	5,1	0	92	6	0	0	1:(1,8-2)	20-30
M	2,8	0,1	0	0	0	0	0		30-40
A	450,3	18,0	0	0	0	0	0		150-500

Пример 3. Свежую водоросль *Laminaria japonica* (25 кг) подготавливают к экстракции и экстрагируют этанолом так, как описано в примере 1.

Обработанную водоросль высушивают, заливают 0,1М раствором соляной кислоты до образования «зеркала» и экстрагируют 12 ч при 20-25⁰С при перемешивании. Экстракт концентрируют до 1/5 первоначального объема на ультрафильтрационной установке с мембраной, имеющей поры 5 кДа, нейтрализуют до pH 6,0 раствором гидроксида натрия и упаривают на РИ до 1 л. Получают концентрат - полисахарид-1, представляющий смесь ламинарана и фукоидана. Концентрат нейтрализуют и осаждают двумя объемами этанола фукоидан (F1). Осадок промывают 96% этанолом, высушивают. Полученный препарат фукоидана представляет порошок кремового цвета, хорошо растворимый в воде, диметилсульфоксиде, не растворим в спирте, ацетоне, гексане, серном эфире; содержание золы составляет 17,0%.

Далее все последующие стадии проводят, как описано в примере 1, но щелочную обработку проводят 1% раствором гидроксида кальция. Полученный альгинат кальция представляет порошок кремового цвета, при растворении в воде образует вязкие гели; содержание золы составляет 17,0%.

В таблице 4 представлены выход, моносахаридный состав и молекулярная масса полисахаридов из *Laminaria japonica*.

Таблица 4

Поли-сахарид	Выход		Моносахаридный состав (нейтральные сахара), %					Fuc/SO ₄ ² моль/моль	Мм, кДа
	граммы	%	ман-ноза	фукоза	галактоза	ксилоза	глюкоза		
L1	7,7	0,3	0	0	3	5	90		4-5
F1	53,0	2,1	2	44	25	10	5	*н.о.	н.о.
L2	21,5	0,9	0	0	0	0	92		5-10
F2	72,0	2,9	0,3	39,5	46,0	0	0,9	1:1,1	н.о.
M	5,7	0,2	0	0	0	0	0		30-40
A	560,3	22,4	0	0	0	0	0		150-500

*н.о. – не определяли

Пример 4. Замороженную водоросль *Alaria marginata* (25 кг) подготавливают к экстракции и экстрагируют этанолом так, как описано в примере 1.

Обработанную водоросль высушивают, заливают 0,1М раствором соляной кислоты до образования «зеркала» и экстрагируют 12 ч при 20-25⁰С при перемешивании. Экстракт концентрируют до 1/5 первоначального объема на ультрафильтрационной установке с мембраной, имеющей поры 5 кДа, нейтрализуют до pH 6,0 раствором гидроксида натрия и упаривают на РИ до 1 л. Далее водоросль обрабатывают так, как описано в примере 1.

Полученный препарат фукоидана (F1 и F2) представляет порошок белого цвета, хорошо растворимый в воде, диметилсульфоксиде; не растворим в спирте, ацетоне, гексане, серном эфире; содержание золы составляет 19,0%.

Далее процесс осуществляют, как описано в примере 1, но осадок полиманнуровой кислоты растворяют в минимальном объеме 1М раствора гидроксида кальция, нейтрализуют и осаждают полиманнуронат кальция (М).

Полученный препарат полимануроната кальция представляет порошок белого цвета, хорошо растворимый в воде, диметилсульфоксиде, не растворим в спирте, ацетоне, гексане, серном эфире; содержание золы составляет 17,0%.

Далее остаток водоросли обрабатывают так, как описано в примере 1.

Полученный препарат альгината натрия представляет порошок коричневого цвета, хорошо растворимый в воде, диметилсульфоксиде; не растворим в спирте, ацетоне, гексане, серном эфире; содержание золы составляет 18,0%.

В таблице 5 представлены выход, моносахаридный состав и молекулярная масса полисахаридов из *Alaria marginata*.

Таблица 5

Поли-сахарид	Выход		Моносахаридный состав (нейтральные сахара), %					Fuc/SO ₄ ²⁻ моль/моль	Мм, кДа
	граммы	%	манноза	фуко- за	галак- тоза	ксило за	глюкоза		
L1	2,5	0,1	0	0	0	0	92		н.о.
F1	42,0	1,7	2	72	6	8	5	*н.о.	н.о.
L2	7,5	0,3	0	0	0	0	93		н.о.
F2	20,0	0,8	4	68	8	10	3	н.о.	н.о.
M	275,0	11,0	0	0	0	0	0		30-40
A	537,5	21,5	0	0	0	0	0		150-500

*н.о. – не определяли

Пример 5. Замороженную водоросль *Alaria fistulosa* (25 кг) подготавливают к экстракции и экстрагируют этанолом так, как описано в примере 1.

Обработанную водоросль высушивают, заливают 0,1М раствором соляной кислоты до образования «зеркала» и экстрагируют 12 ч при 20-25⁰С при перемешивании. Экстракт концентрируют до 1/5 первоначального объема на ультрафильтрационной установке с мембраной, имеющей поры 5 кДа, нейтрализуют раствором гидроксида натрия и

Далее процесс осуществляют, как описано в примере 1, но осадок полиманнуроновой кислоты растворяют в минимальном объеме 1М раствора оксалата аммония, нейтрализуют и осаждают полиманнуронат аммония (М).

Полученный препарат полиманнуроната аммония представляет порошок белого цвета, хорошо растворимый в воде, диметилсульфоксиде, не растворим в спирте, ацетоне, гексане, серном эфире; содержание золы составляет 21,0%.

Далее процесс осуществляют, как описано в примере 1

В таблице 6 представлены выход, моносахаридный состав и молекулярная масса полисахаридов из *Alaria fistulosa*.

Таблица 6

Поли-сахарид	Выход		Моносахаридный состав (нейтральные сахара), %					Fuc/SO ₄ ²⁻ моль/моль	Мм, кДа
	граммы	%	манноза	фукоза	галактоза	ксилоза	глюкоза		
L1	10,0	0,4	0	0	0	0	92		н.о.
F1	44,5	1,8	1	75	7	8	5	*н.о.	н.о.
L2	12,5	0,5	0	0	0	0	94		н.о.
F2	0	0							
М	552,5	22,1	0	0	0	0	0		30-40
А	375,3	15,0	0	0	0	0	0		150-500

*н.о. — не определяли

Пример 6. Свежую водоросль *Undaria pinnatifida* (25 кг) готовят к экстракции и экстрагируют этанолом, как описано в примере 1.

Обработанную водоросль высушивают, заливают 0,1М раствором соляной кислоты до образования «зеркала» и экстрагируют 12 ч при 20-25⁰С при перемешивании. Экстракт концентрируют до 1/5 первоначального объема на ультрафильтрационной установке с мембраной, имеющей поры 5 кДа, нейтрализуют раствором гидроксида натрия и

Полученный препарат фукоидана (F1 и F2). представляет порошок белого цвета хорошо растворимый в воде, диметилсульфоксиде; не растворим в спирте, ацетоне, гексане, серном эфире; содержание золы составляет 30,0%.

Далее процесс осуществляют так, как описано в примере 1, но осадок полиманнуровой кислоты растворяют в минимальном объеме 1М раствора гидроксида магния, нейтрализуют и осаждают полиманнуронат магния (М).

Полученный препарат полиманнуроната магния представляет порошок белого цвета, хорошо растворимый в воде, диметилсульфоксиде, не растворим в спирте, ацетоне, гексане, серном эфире; содержание золы составляет 19,0%.

Далее все последующие стадии проводят так, как описано в примере 1, но щелочную обработку водоросли проводят 1% раствором гидроксида магния и получают альгинат магния (А). Полученный препарат альгината магния представляет собой порошок кремового цвета, хорошо растворимый в воде, диметилсульфоксиде; не растворим в спирте, ацетоне, гексане, серном эфире; содержание золы составляет 20,0%.

В таблице 7 представлен моносахаридный состав и выходы полисахаридов из *Undaria pinnatifida*.

Таблица 7

Поли-сахарид	Выход		Моносахаридный состав (нейтральные сахара), %				
	граммы	%	манноза	фукоза	галактоза	ксилоза	глюкоза
L1	0	0	0	0	0	0	0
F1	77,0	3,1	1	44	51	0	0
L2	0	0	0	0	0	0	0
F2	152,0	6,1	0,3	39,5	46,0	0	0,9
М	58,0	2,3	0	0	0	0	0
А	375,3	15,0	0	0	0	0	0

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ комплексной переработки бурых водорослей с получением препаратов медицинского и косметологического назначения, заключающийся в том, что водоросль обрабатывают этанолом, этанольный экстракт отделяют, этанол отгоняют и получают концентрат биологически активных низкомолекулярных соединений, затем обработанную водоросль экстрагируют раствором разбавленной соляной кислоты при pH 2,0-2,5, экстракт концентрируют на ультрафильтрационной установке, нейтрализуют и получают концентрат, содержащий полисахарид-1, представляющий смесь ламинарана и фукоидана, концентрат нейтрализуют, после этого этанолом последовательно осаждают фукоидан (F1) и ламинаран (L1), осадки промывают этанолом и высушивают, затем обработанную водоросль последовательно дважды экстрагируют горячей водой при pH 3,5-4,0, экстракты объединяют и концентрируют на ультрафильтрационной установке, концентрат упаривают и получают полисахарид-2, представляющий смесь ламинарана, фукоидана и полиманнуроновой кислоты, доводят pH экстракта до значения 2,0-2,5 и отделяют осадок полиманнуроновой кислоты центрифугированием, осадок растворяют в щелочном растворе и осаждают этанолом соль полиманнуроновой кислоты (M), осадок промывают этанолом и высушивают, супернатант нейтрализуют и этанолом осаждают последовательно фукоидан (F2) и ламинаран (L2), осадки промывают этанолом и высушивают, затем остаток водоросли подвергают щелочной обработке при pH 8-9, экстракт концентрируют на ультрафильтрационной установке, нейтрализуют и осаждают этанолом полисахарид-3, представляющий соль альгиновой кислоты (A), осадок промывают этанолом и высушивают.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что используют водоросль *Laminaria cichorioides* и/или *Laminaria japonica*, и/или *Alaria marginata*, и/или *Alaria fistulosa*, и/или *Fucus evanescens*, и/или *Undaria pinnatifida*.

3. Способ по пп.1 и 2, отличающийся тем, что используют свежую или замороженную водоросль.

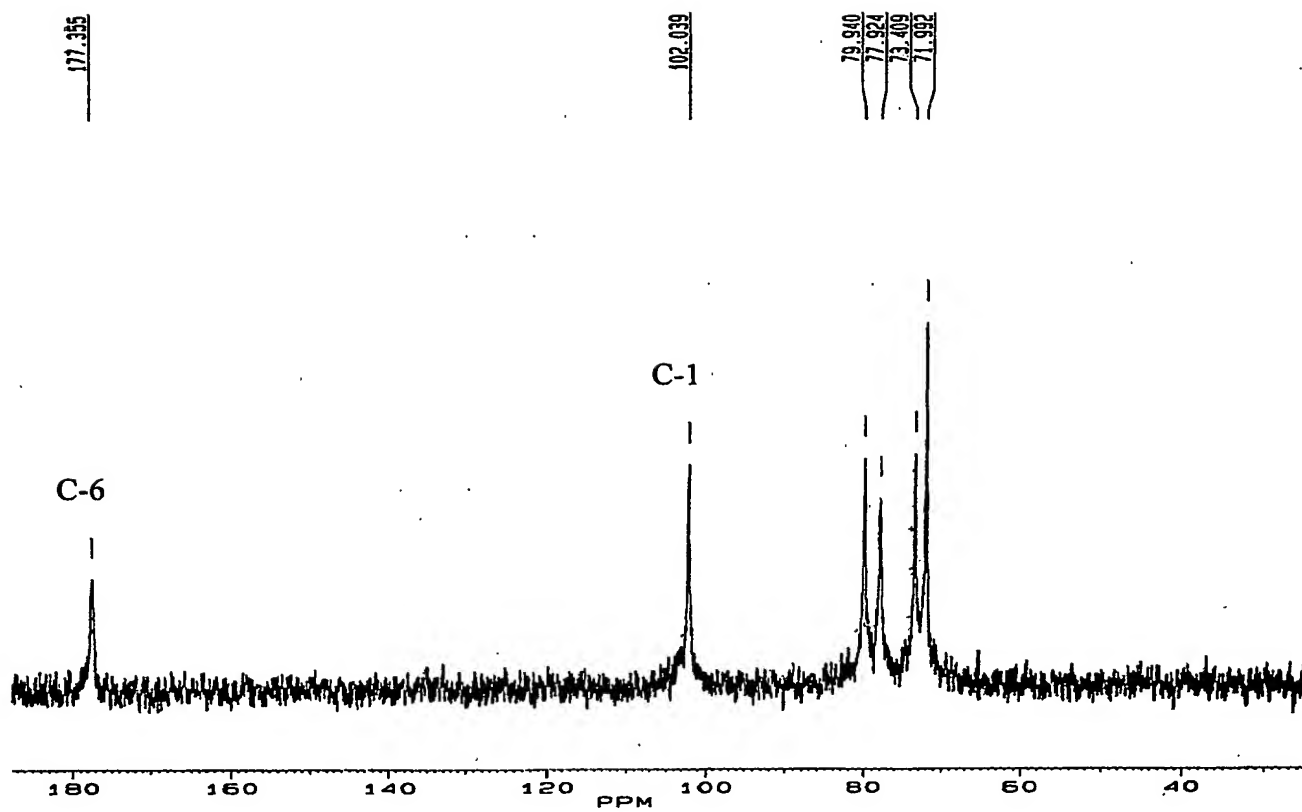
4. Способ по пп.1-3, отличающийся тем, что обработку водоросли этанолом осуществляют в течение 20-24 ч при температуре 40-60⁰С.

5. Способ по п.1 отличающийся тем, что обработанную этанолом водоросль высушивают, экстракцию раствором разбавленной соляной кислоты осуществляют в течение 10-14 ч при температуре 20-25⁰С, а экстракцию горячей водой – дважды в течение 2-4 ч и 1-2 ч соответственно.

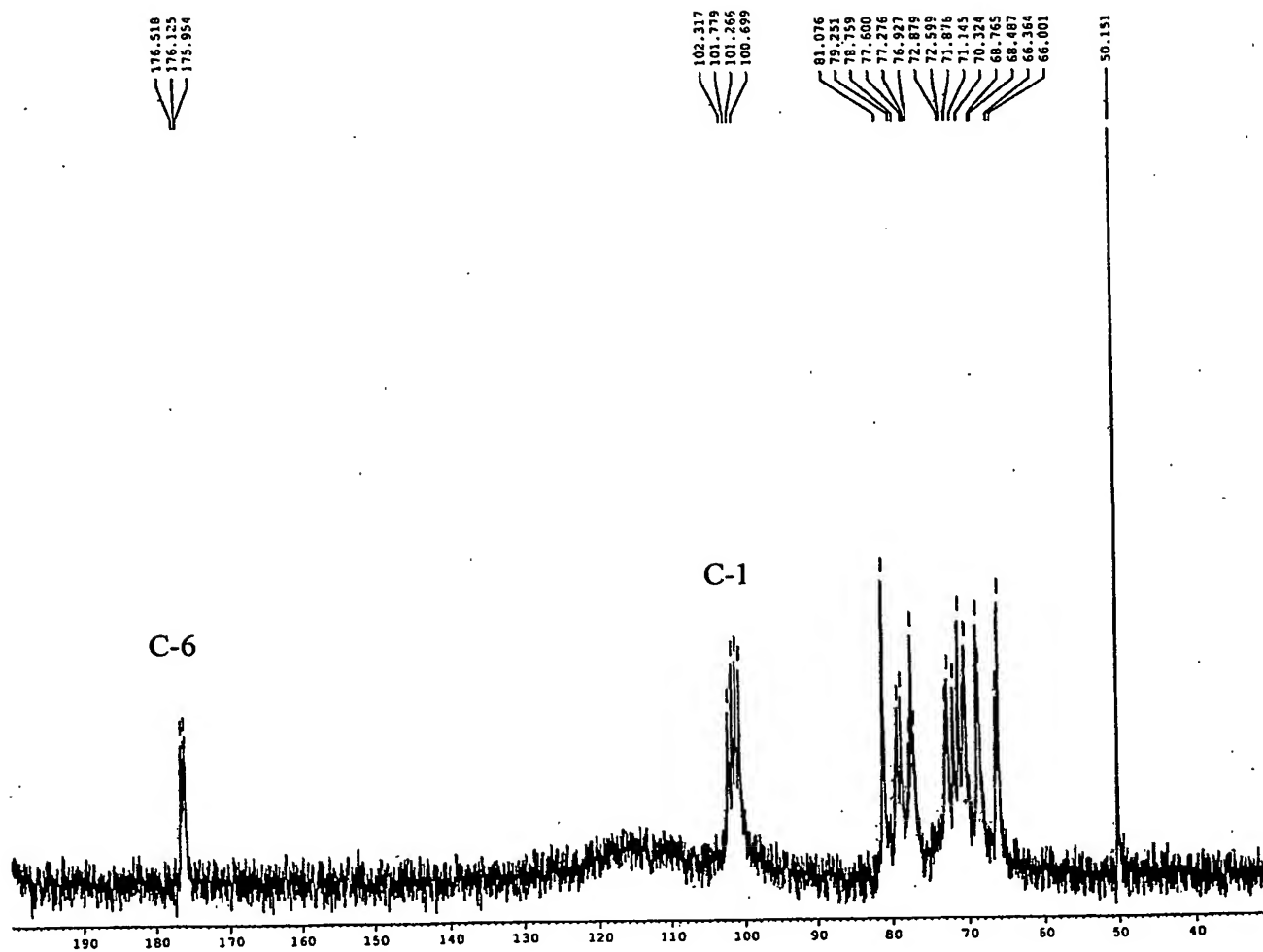
6. Способ по п.1, отличающийся тем, что экстракты последовательно концентрируют на ультрафильтрационной установке на полых волокнах с мембранами, имеющими поры от 5 до 100 кДа.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что с целью получения соли полиманнуроновой кислоты осадок полиманнуроновой кислоты обрабатывают раствором гидроксида натрия или оксалата аммония, или гидроксида кальция, или гидроксида магния.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что с целью получения соли альгиновой кислоты щелочную обработку водоросли осуществляют растворами гидроксида натрия или оксалата аммония, или гидроксида кальция, или гидроксида магния в течение 2-4 ч при температуре 55-65⁰С.



фиг.1



фиг. 2

Способ комплексной переработки бурых водорослей с получением препаратов для медицины и косметологии

Изобретение относится к технологии комплексной переработки бурых водорослей.

Водоросль обрабатывают этанолом, экстракт отделяют, этанол отгоняют и получают концентрат биологически активных низкомолекулярных соединений; обработанную водоросль экстрагируют раствором разбавленной соляной кислоты при pH 2,0-2,5, экстракт концентрируют на ультрафильтрационной установке, нейтрализуют, упаривают и получают концентрат, содержащий полисахарид-1, представляющий смесь ламинарана и фукоидана; концентрат нейтрализуют и последовательно осаждают этанолом фукоидан (F1), затем ламинаран (L1), осадки промывают этанолом и высушивают; обработанную водоросль дважды экстрагируют горячей водой при pH 3,5-5,0; экстракты объединяют и концентрируют на ультрафильтрационной установке, концентрат упаривают и получают полисахарид-2, представляющий смесь ламинарана, фукоидана и полиманнуроновой кислоты; доводят pH концентрата до значения 2,0-2,5, отделяют осадок полиманнуроновой кислоты центрифугированием; осадок растворяют в щелочном растворе и осаждают этанолом соль полиманнуроновой кислоты (M), осадок промывают этанолом и высушивают; супернатант нейтрализуют и этанолом осаждают последовательно фукоидан (F2) и ламинаран (L2), осадки промывают этанолом и высушивают; остаток водоросли подвергают щелочной обработке при pH 8-9, экстракт концентрируют на ультрафильтрационной установке и осаждают этанолом полисахарид-3, представляющий соль альгиновой кислоты (A), осадок промывают этанолом и высушивают. Способ предусматривает использование свежей или замороженной водоросли *Laminaria cichorioides* и/или *Laminaria japonica*, и/или *Alaria marginata*, и/или *Alaria fistulosa*, и/или *Fucus evanescens*, и/или *Undaria pinnatifida*. Технический результат заключается в том, что получают полный набор индивидуальных полисахаридов,

Эти препараты имеют стандартные характеристики и могут найти применение в медицине в качестве терапевтических агентов. Получают также концентрат, богатый биологически активными низкомолекулярными соединениями, который может найти применение в парфюмерно-косметической промышленности. Остаток водоросли после получения концентрата и препаратов полисахаридов можно использовать как кормовую добавку.

7 з.л.ф-лы., 7 табл., 2 фиг.

FEDERAL AGENCY
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

**FEDERAL INSTITUTE
OF INDUSTRIAL PROPERTY**
121858, Moscow, Berezhkovskaya Nab., 30, Block 1
Telephone: 240-60-15 Telex: 114818 ИИЧ. Fax: 243-33-37

Our No. 20/12-588

September 15, 2004

CERTIFICATE

The Federal Institute of Industrial Property (hereafter referred to as the Institute) hereby certifies that the attached documents are an exact reproduction of the initial specification, set of claims, abstract and drawings (if resent) of Application No. 2003123744 for granting an invention patent, filed with the Institute on the 28th day of July in the year 2003 (28.07.2003).

Title of the invention:

Method for comprehensive processing
brown algae to produce preparations
for medicine and cosmetology

Applicant:

PACIFIC INSTITUTE OF BIOORGANIC
CHEMISTRY, FAR-EASTERN DIVISION
OF RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES

Actual inventors:

SHEVCHENKO Natalya Mikhailovna
IMBS Tatyana Igorevna
URVANTSEVA Anzhela Mikhailovna
KUSAJKIN Mikhail Igorevich
KORNIENKO Vladimir Gennadiyevich
ZVYAGINTSEVA Tatyana Nikolaevna
ELYAKOVA Lyudmila Alekseevna

Head of Department 20

A.L. Zhuravlev

**METHOD FOR COMPREHENSIVE PROCESSING BROWN ALGAE
TO PRODUCE PREPARATIONS FOR MEDICINE AND COSMETOLOGY**

The present invention relates to the technology of comprehensive processing brown algae with simultaneous producing individual preparations of acid and neutral polysaccharides which may find application in medicine, and also with producing a complex of low-molecular biologically active compounds, which may find application in the perfumery and cosmetic industry.

Known in the art is a method for producing biologically active water-soluble polysaccharides of brown algae, namely, laminaran and fucoidan, which contemplates chromatographic separation of these polysaccharides on polytetrafluoroethylene (RU 2135518 C1, 27.08.1999).

However, this method is not a method for comprehensive processing of brown algae. Such polysaccharides as water-soluble polymannuronate and alkali-soluble alginates are not extracted by this method from algae.

Known in the art is a method for comprehensive processing of brown algae from the family of laminarian algae, in which method, by repeated treatment of these algae with extracting solutions, crystallization precipitation and filtering, mannitol, alginic acid, calcium alginate, sodium alginate, potassium alginate, ammonium alginate, mixed water-soluble salts of alginic acid, having a high thickening capacity, and also a feed additive from algae waste are produced (RU 2070808 C1, 27.12.1996).

However, in the production of alginates by this method, biologically active water-soluble polysaccharides of brown algae prove to be in wastes.

A method is known for processing brown algae, namely, laminaria and Fucus vesiculosus for producing lipid and water-soluble concentrates (RU 2132622 C1, 10.07.1999). A powder prepared from the water-soluble substances of the extract of brown algae comprises a complex of polysaccharides, mannitol, vitamins, mineral substances. This method does not contemplate individual polysaccharides, such as fucoidan, laminaran, polymannurate, alginates.

Known is a method for obtaining biologically active substances from White Sea laminaria, according to which after the polysaccharide-protein complex has been precipitated from an alcoholic solution, a complex of laminaran with fucoidan is precipitated, this being followed by separating the complex into individual substances (RU 2028153 C1, 09.02.1995).

However, as the Applicant of this method has indicated, some disadvantages inherent in the algae processing technology, as well as obtaining a polysaccharide-protein complex of laminaran and fucoidan having the same kind of biological activity (laxative effect), have led him to the creation of another method for obtaining biologically active substances out of laminaria for medicinal purposes (RU 2194525 C1, 20.12.2002). The method consists in that the stock material is dried, reduced, degreased with chloroform, extracted successively with ethanol, hot water, and sodium carbonate. As a result, from the algae of one kind, namely, from the sugary White Sea laminaria, three products are obtained: mannitol, overall polysaccharide-protein complex, and sodium alginate.

This method is not free of the following disadvantages: drying the algae, followed by degreasing thereof with chloroform leads to the removal of a valuable lipid complex, only mannitol being produced from the alcoholic extract, the rest of the low-molecular compounds of the algae prove to be in the wastes. The obtained polysaccharide-protein complex "Laminarid SB" has a narrow range of biological activity, namely, it produces a detoxicating and laxative effect.

The method does not allow producing individual biologically active polysaccharides, such as laminaran, fucoidan, polymannuronate.

It is known that polysaccharides of brown algae have various biologically active properties, and therefore the use of preparations from algae is promising in medicine. Fucoidans were found to display anticoagulant, antineoplastic, hypolipidemic, antiviral (including anti-HIV) activities (Nagumo T., Nishino T., Fucan Sulfates and Their Anticoagulant Activities // In: Polysaccharides in Medicinal Applications. (Ed. S. Dumitriu). University of Sherbrooke, Quebec, Canada. New-York-Basel-Hong Kong. 1996. pp. 545—57; Zhuang C., Itoh H., Mizuno T., Ito H.. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, umitoranoo (*Sargassum thunbergii*) // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1995. Vol. 59. pp. 563—567; Beress A., Wassermann O., Bruhn T. et al. A New Procedure for the Isolation of Anti-HIV Compounds (Polysaccharides and Polyphenols) from the Marine Alga *Fucus Vesiculosus* // Natural Products-Lloydia. 1993. Vol. 56. 4. pp. 478—488).

Laminaran has antineoplastic activity (Remedium-Journal about the Russian market of drugs, 1992, No. 4, p. 49).

Polymannuronate has antineoplastic and hypolipidemic activity (Zh. Biologiya Morya 2001, vol. 27, No. 3, pp. 151—162).

At the present moment the Applicant is not aware of methods for comprehensive processing brown algae to produce individual preparations of fucoidan, laminaran, polymannuronate, alginates with standard characteristics. The known methods and, particularly, the method closest to the claimed one (RU 2194525 C1, 20.12.2002), allow producing not individual preparations, but complexes of polysaccharides. However, the physiological effect produced on the organism by polysaccharides comprised in the complexes is different (Yu.S. Khotimchenko, V.V. Kovalev, O.V. Savchenko, O.A. Ziganshina, The Physicochemical Prop-

erties, Physiological Activity and Use of Alginates-Polysaccharides of Brown Algae. Zh Biologiya Morya 2001, vol. 27, No. 3, pp. 151—162). Therefore the use of polysaccharides of algae as therapeutic agents is restrained by problems with obtaining products having standard characteristics.

In view of the foregoing, it is an actual problem to provide a method for comprehensive processing brown algae to produce individual preparations of acid and neutral polysaccharides with standard characteristics, which may find application in medicine, and also a concentrate of low-molecular biologically active substances, which may find application in the perfumery and cosmetic industry.

The posed problem is solved by the provision of a method for comprehensive processing of brown algae, which consists in the following:

(a) algae are treated with ethanol, the extract is separated, ethanol is distilled off, and a concentrate of biologically active low-molecular compounds is obtained;

(b) the treated algae are extracted with a solution of diluted hydrochloric acid at pH 2.0—2.5, the extract is concentrated in an ultrafiltration apparatus, neutralized, evaporated, and a concentrate is obtained which contains polysaccharide-1 comprising a mixture of laminaran and fucoidan;

(c) the concentrate is neutralized, and fucoidan (F1) and then laminaran (L1) are successively precipitated with ethanol, the precipitates are washed with ethanol and dried;

(d) the treated algae are extracted twice with hot water at pH 3.5—5.0;

(e) the extracts are combined and concentrated in an ultrafiltration apparatus, the concentrate is evaporated, and polysaccharide-2 is obtained, which comprises a mixture of laminaran, fucoidan, and polymannuronic acid;

(f) the pH of the concentrate is adjusted to 2.0—2.5, the precipitate of polymannuronic acid is separated by centrifugation;

(g) the precipitate is dissolved in an alkaline solution, and polymannuronic acid salt (M) is precipitated with ethanol, the precipitate is washed with ethanol and dried;

(h) the supernatant is neutralized and fucoindan (F2) and laminaran (L2) are precipitated successively with ethanol, the precipitates are washed with ethanol and dried;

(i) the algae residue is subjected to alkali treatment at pH 8—9, the extract is concentrated in an ultrafiltration apparatus, and polysaccharide-3, which comprises alginic acid salt (A), is precipitated with ethanol, the precipitate is washed with ethanol and dried.

The proposed new method is designed for comprehensive processing Far-Eastern species of brown algae, such as *Laminaria cichorioides*, and/or *Laminaria japonica*, and/or *Alaria marginata*, and/or *Alaria fistulosa*, and/or *Fucus evanescens*, and/or *Undularia pinnatifida*. However, the proposed method is universal, it is applicable to other species of algae as well, both to Far-Eastern and to any other brown algae. But in each particular case there will be obtained a definite set of acid polysaccharides, differing in the yields, structural characteristics and monosaccharide composition.

The method contemplates using fresh or frozen algae, because polyphenols and caratinoids become easily oxidized as the algae are dried. The method does not require introducing the step of algae reduction, because after deep freezing and subsequent thawing the cell substances of the integral thallus of algae are recovered by extractants more completely.

According to the proposed method, fresh or frozen algae, after the removal of small shells and mechanical admixtures, are covered with ethanol and maintained for 20—24 hrs at a temperature of 40—60°C, the ethanolic extract is decanted, the ethanol is distilled off, and an ethanolic concentrate of biologically active low-molecular compounds is obtained. The

concentrate is rich in polyphenols, mannitol, carotinoids, amino acids, iodine, mineral salts, group B vitamins, and may find application in the perfume and cosmetic industry.

Treated algae are dried, covered with a diluted solution of hydrochloric acid, and extracted during 10—14 hrs at 20—25°C with stirring. The extract is concentrated in an ultrafiltration apparatus provided with a membrane having 5 kDa pores, neutralized with a sodium hydroxide solution to pH 6.0, and evaporated. The polysaccharide-1 concentrate which comprises a mixture of laminaran and fucoidan is thus obtained. The concentrate is neutralized, and fucoidan (F1) is precipitated with two volumes of ethanol, the precipitate is washed with 96% ethanol and dried. The fucoidan preparation is thus obtained. Further, laminaran (L1) is precipitated from the solution by adding two more volumes of ethanol, the precipitate is washed with 96% ethanol and dried. The laminaran preparation is thus obtained.

Then the algae are extracted successively twice with hot water at pH 3.5—4.0 with stirring during 2—4 and 1—2 hrs, respectively. The extracts are combined, concentrated in an ultrafiltration apparatus provided with a membrane having 15 kDa pores, the concentrate is evaporated. Polysaccharide-2 is thus obtained, which comprises a mixture of laminaran, fucoidan and polymannuronic acid. Then pH of the extract is adjusted to 2.0—2.5, the precipitate of polymannuronic acid is separated by centrifugation. For obtaining polymannuronic acid salt, the precipitate is dissolved in a minimal volume of sodium hydroxide or ammonium oxalate, or calcium hydroxide, or magnesium hydroxide, then the solution is neutralized, and polymannuronic acid salt (M) is precipitated by adding two volumes of ethanol, the precipitate is washed with 96% ethanol and dried. The polymannuronate preparation is thus obtained.

The supernatant, formed after the precipitation of polymannuronic acid, is neutralized, and fucoidan (F2) is precipitated by adding two volumes of ethanol, the precipitate is washed with 96% ethanol and dried. The fucoidan preparation is thus obtained. By adding two more

volumes of ethanol, laminaran (L2) is precipitated, the precipitate is washed with 96% ethanol and dried. The laminaran preparation is thus obtained.

For obtaining alginic acid salt, the algae residue is subjected to alkali treatment with a solution of sodium hydroxide or ammonium oxalate, or calcium hydroxide, or magnesium hydroxide at pH 8—9 during 2—4 hrs at a temperature of 55—65°C, the extract is concentrated in an ultrafiltration apparatus provided with a membrane having 100 kDa pores, neutralized, and polysaccharide-3 comprising alginic acid salt (A) is precipitated with ethanol. The precipitate is washed with 96% ethanol and dried. The alginate preparation is thus obtained.

The technical result of the claimed method consists in that it allows comprehensive processing brown algae and obtaining a complete set of individual polysaccharides with standard characteristics. The obtained preparations of acid and neutral polysaccharides may find application in medicine as therapeutic agents. The standard characteristics of these preparations are presented in the exemplary embodiments of the proposed method.

The proposed method makes it possible to obtain also a concentrate rich in biologically active low-molecular compounds, which may find application in the perfume and cosmetic industry.

The algae residue after obtaining the concentrate and polysaccharide preparations may be used as a feed additive.

The claimed method is noted for simplicity and technological effectiveness, because it comprises, mainly, extraction, ultrafiltration and fractional precipitation of the target products. With the aid of the last-mentioned technique it becomes possible to rapidly separate polysaccharides-1 and 2 into individual preparations: fucoidan, laminaran and polymannuronic acid and, depending on the kind of algae, to obtain particular products with good yields. Ethanol is

distilled off and reused. Highly efficient hollow fibers are used for the ultrafiltration and dialysis.

The composition and yield of polysaccharides-1,2,3 obtained by the proposed method from different species of algae of the laminarian order and of the fucus order are presented in Table 1.

Table 1

Name of algae	Yield of polysaccharide, % of dry algae weight					
	Polysaccharide-1		Polysaccharide-2			Polysaccharide-3
	L1*	L**	L2	F2	M***	A****
<i>Fucus evanescens</i>	0.5—0.6	3.4—4.0	0.3—0.5	7.0—7.8	0.2—0.3	14.0—14.5
<i>Laminaria cichorioides</i>	4.1—5.0	2.0—2.5	6.0—6.5	5.0—5.5	0—0.1	18.0—19.0
<i>Laminaria japonica</i>	0.3—0.5	2.1—3.0	0.7—1.0	2.7—3.0	0.2—0.3	22.0—23.0
<i>Alaria marginata</i>	0—0.1	0.5—1.0	0.2—0.3	0.7—1.0	11.0—11.5	21.0—22.1
<i>Alaria fistulosa</i>	0.2—0.4	1.5—2.0	0.3—0.5	0	21.5—22.1	14.5—15.0
<i>Undaria pinnatifida</i>	0	3.0—3.5	0	6.0—7.0	2.0—3.0	15.0—16.0

L* - laminaran, F** - fucoidan, M*** - polymannuronate, A**** - alginate

The preparations of acid and neutral polysaccharides, produced by the claimed method were subjected to qualitative and quantitative analysis with the aid of the following methods:

1. Phenol-sulfuric acid method — for determining the content of general sugars (Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. // Analyt. Chem. 1956. Vol. 28. P. 350—356;

2. The monosaccharide composition (neutral sugars) was determined by the high-performance liquid chromatography. Samples of polysaccharides (5 mg) were subjected to hydrolysis with 4N HCl at 100°C (2 hrs). The monosaccharide composition of the products of acid hydrolysis was determined by the HPLC technique on an IC-5000 Biotronic hydrocarbon analyzer, Durrum DA-X8-11 resin, 385x3.2 mm column, 60°C); detection was performed by the bicinchoninate method; Shimadzu C.-R2 AX integrating system). Monosaccharides (Pha, Rib, Man, Fuc, Gal, Xyl, Glc) were used as HPLC standards (Waffenschmidt S., Jaenicke L., Assay of Reducing Sugars in the Nanomole Range with 2,2'-Bicinchoninate. // Anal. Biochem. 1987. Vol. 165. P. 337—340).

3. ^{13}C -NMR spectra were obtained at 60°C on a Bruker-Physic WM NMR spectrometer with 62.9 working frequency in D_2O at 70°C. The samples of polysaccharides were dissolved in D_2O and dimethylsulfoxide.

The essence of the method is explained by the following examples of particular embodiment:

Example 1. Fresh algae *Fucus evanescens* in an amount of 25 kg, after the removal of small shells and mechanical admixtures, are placed into an extractor and covered with ethanol in an 1/1 w/v ratio, and maintained at 50°C for 22 hrs. The ethanolic extract is decanted, ethanol is distilled off in a vacuum circulation evaporation apparatus (VEA), and a concentrate of biologically active low-molecular compounds is obtained. The distilled-off ethanol is reused.

The treated algae are dried, covered with 0.1 M solution of hydrochloric acid until a "mirror" is formed, and extracted during 12 hrs at 20—25°C with stirring. The extract is concentrated to 1/5 of the initial volume in an ultrafiltration apparatus provided with a membrane having 5 kDa pores, neutralized to pH 6.0 with a solution of sodium hydroxide, and evaporated in a rotary evaporator (RE) to 1 liter. The concentrate thus obtained is polysaccharide-1, which comprises a mixture of laminaran and fucoidan. The concentrate is neutralized, and fucoidan (F1) is precipitated with two volumes of ethanol. The precipitate is washed with 96%

ethanol and dried. The obtained fucoidan preparation comprises a cream-colored powder, readily soluble in water and in dimethylsulfoxide; insoluble in alcohol, acetone, hexane and ethyl ether; ash content is 26.6%.

Laminaran (L1) is precipitated from the solution by adding two more volumes of ethanol, the precipitate is washed with 96% ethanol and dried. The obtained laminaran preparation comprises a cream-colored powder, readily soluble in water and in dimethylsulfoxide; insoluble in alcohol, acetone, hexane and ethyl ether; ash content is 26.6%.

Then the algae are successively extracted twice with hot water with stirring during 3 hrs and 1.5 hrs, respectively, at pH 3.5—4.0. The extracts are combined, concentrated to 1/10 of the initial volume in an ultrafiltration apparatus provided with a membrane having 15 kDa pores, and evaporated in a RE to 1 liter. The concentrate thus obtained is polysaccharide-2, which comprises a mixture of laminaran, fucoidan and polymannuronic acid. The pH of the extract is adjusted to 2.0—2.5, and the polymannuronic acid precipitate is separated by centrifugation. The precipitate is dissolved in a minimal volume of 1M sodium hydroxide solution, neutralized, and sodium polymannuronate (M) is precipitated by adding two volumes of ethanol, washed with 96% ethanol, and dried. The sodium polymannuronate preparation thus obtained comprises a cream-colored powder, readily soluble in water and in dimethylsulfoxide; insoluble in alcohol, acetone, hexane and ethyl ether; ash content is 15.0%.

The ^{13}C NMR spectrum of sodium polymannuronate is presented in Figure 1.

The supernatant, formed after the precipitation of polymannuronic acid, is neutralized, and fucoidan (F2) is precipitated by adding two volumes of ethanol, the precipitate is washed with 96% ethanol and dried. The obtained fucoidan preparation comprises a cream-colored powder, readily soluble in water and in dimethylsulfoxide; insoluble in alcohol, acetone, hexane and ethyl ether; ash content is 25.0%.

By adding two more volumes of ethanol, laminaran (L2) is precipitated, the precipitate is washed with 96% ethanol and dried. The laminaran preparation thus obtained comprises a cream-colored powder, readily soluble in water and in dimethylsulfoxide; insoluble in alcohol, acetone, hexane and ethyl ether; ash content is 2.1%.

After that the algae residue is covered with 1% solution of sodium hydrocarbonate until a "mirror" is formed, and extracted during 3 hrs at 65°C. The extract is concentrated to make its volume 3.5 times smaller than the initial one, in an ultrafiltration apparatus provided with a membrane having 100 kDa pores, neutralized, and polysaccharide-3, comprising sodium alginate (A), is precipitated by using two volumes of ethanol. The precipitate is washed with 96% ethanol and dried. The obtained sodium alginate preparation comprises a cream-colored powder, readily soluble in water and in dimethylsulfoxide; insoluble in alcohol, acetone, hexane and ethyl ether; ash content is 18.0%.

The ^{13}C NMR spectrum of sodium alginate is presented in Figure 2.

The yield, monosaccharide composition and molecular weight of the polysaccharides obtained from *Fucus evanescens* are presented in Table 2.

Table 2

Poly-saccharide	Yield		Monosaccharide composition (neutral sugars), %					Fuc/SO ₄ ²⁻ , mole/mole	Mm, kDa
	grams	%	mannose	fucose	galactose	xylose	glucose		
L1	14.5	0.6	0	0	0	3	89		5-10
F1	73.0	3.4	1	74	11	6	4	1:(0.7-1)	20-500
L2	12.5	0.5	0	0	0	0	100		5-10
F2	177.0	7.1	4	82	4	3	0	1:(0.8-1)	15-500
M	7.5	0.3	0	0	0	0	0		30-40
A	360.0	14.4	0	0	0	0	0		150-500

Example 2. Frozen algae *Laminaria cichorioides* (25 kg) are prepared for the extraction and extracted as described in Example 1.

The treated algae are dried, covered with 0.1 M solution of hydrochloric acid until a "mirror" is formed, and extracted during 12 hrs at 20—25°C with stirring. The extract is concentrated to 1/5 of the initial volume in an ultrafiltration apparatus provided with a membrane having 5 kDa pores, neutralized to pH 6.0 with a solution of sodium hydroxide, and evaporated in a RE to 1 liter. A concentrate, polysaccharide-1, is thus obtained, which comprises a mixture of laminaran and fucoidan. The concentrate is neutralized, and fucoidan (F1) is precipitated with two volumes of ethanol. The precipitate is washed with 96% ethanol and dried. The obtained fucoidan preparation comprises a cream-colored powder, readily soluble in water and in dimethylsulfoxide; insoluble in alcohol, acetone, hexane and ethyl ether; ash content is 21.0%.

Laminaran (L1) is precipitated from the supernatant by adding two more volumes of ethanol, the precipitate is washed with 96% ethanol and dried. The obtained laminaran preparation comprises a cream-colored powder, readily soluble in water and in dimethylsulfoxide; insoluble in alcohol, acetone, hexane and ethyl ether; ash content is 2.2%.

Further, all the subsequent steps are carried out as described in Example 1, but the alkali treatment is performed with 1% solution of ammonium oxalate. An ammonium alginate preparation is thus obtained, which comprises a cream-colored powder, readily soluble in water and in dimethylsulfoxide; insoluble in alcohol, acetone, hexane and ethyl ether; ash content is 15.0%.

The yield, monosaccharide composition and molecular weight of the polysaccharides obtained from *Laminaria cichorioides* are presented in Table 3.

Table 3

Poly-saccharide	Yield		Monosaccharide composition (neutral sugars), %					Fuc/SO ₄ ²⁻ , mole/mole	Mr KDa
	grams	%	man-nose	fucose	galac-tose	xylose	glucose		
L1	102.0	4.1	0	0	0	0	97		5-10
F1	62.5	2.5	1	90	1	0	5	1:(1.6-1.8)	20-40
L2	152.1	6.1	0	0	0	0	100		5-10
F2	127.2	5.1	0	92	6	0	0	1:(1.8-2)	20-30
M	2.8	0.1	0	0	0	0	0		30-40
A	450.3	18.0	0	0	0	0	0		150-500

Example 3. Fresh algae *Laminaria japonica* (25 kg) are prepared for the extraction and extracted as described in Example 1.

The treated algae are dried, covered with 0.1 M solution of hydrochloric acid until a "mirror" is formed, and extracted during 12 hrs at 20—25°C with stirring. The extract is concentrated to 1/5 of the initial volume in an ultrafiltration apparatus provided with a membrane having 5 kDa pores, neutralized to pH 6.0 with a solution of sodium hydroxide, and evaporated in a RE to 1 liter. A concentrate, polysaccharide-1, is thus obtained, which comprises a mixture of laminaran and fucoidan. The concentrate is neutralized, and fucoidan (F1) is precipitated with two volumes of ethanol. The precipitate is washed with 96% ethanol and dried. The obtained fucoidan preparation comprises a cream-colored powder, readily soluble in water and in dimethylsulfoxide; insoluble in alcohol, acetone, hexane and ethyl ether; ash content is 17.0%.

Further, all the subsequent steps are carried out as described in Example 1, but the alkali treatment is performed with 1% solution of calcium hydroxide. A calcium alginate preparation is thus obtained, which comprises a cream-colored powder which forms viscous gels when dissolved in water; ash content is 17.0%.

The yield, monosaccharide composition and molecular weight of the polysaccharides obtained from *Laminaria japonica* are presented in Table 4.

Table 4

Poly-saccharide	Yield		Monosaccharide composition (neutral sugars), %					Fuc/SO ₄ ²⁻ , mole/mole	Mm, KDa
	grams	%	man-nose	fucose	galac-tose	xylose	Glucose		
L1	7.7	0.3	0	0	3	5	90		4-5
F1	53.0	2.1	2	44	25	10	5	* n.d.	n.d.
L2	21.5	0.9	0	0	0	0	92		5-10
F2	72.0	2.9	0.3	39.5	46.0	0	0.9	1:1.1	n.d.
M	5.7	0.2	0	0	0	0	0		30-40
A	560.3	22.4	0	0	0	0	0		150-500

* n.d. — was not determined.

Example 4. Frozen algae *Alaria marginata* (25 kg) are prepared for the extraction and extracted as described in Example 1.

The treated algae are dried, covered with 0.1 M solution of hydrochloric acid until a "mirror" is formed, and extracted during 12 hrs at 20—25°C with stirring. The extract is concentrated to 1/5 of the initial volume in an ultrafiltration apparatus provided with a membrane having 5 kDa pores, neutralized to pH 6.0 with a solution of sodium hydroxide, and evaporated in a RE to 1 liter. Further, the algae are treated as described in Example 1.

The obtained fucoidan preparation (F1 and F2) comprises a white powder, readily soluble in water and in dimethylsulfoxide; insoluble in alcohol, acetone, hexane and ethyl ether; ash content is 19.0%.

Further the process is carried out as described in Example 1, but the precipitate of polymannuronic acid is dissolved in a minimal volume of 1M solution of calcium hydroxide, neutralized, and calcium polymannuronate (M) is precipitated.

The obtained calcium polymannuronate preparation comprises a white powder, readily soluble in water and in dimethylsulfoxide; insoluble in alcohol, acetone, hexane and ethyl ether; ash content is 18.0%.

The yield, monosaccharide composition and molecular weight of the polysaccharides from *Alaria marginata* are presented in Table 5.

Table 5

Poly-saccharide	Yield		Monosaccharide composition (neutral sugars), %					Fuc/SO ₄ ²⁻ , mole/mole	Mm, KDa
	grams	%	man-nose	fucose	galactose	Xylose	Glucose		
L1	2.5	0.1	0	0	0	0	92		n.d.
F1	42.0	1.7	2	72	5	8	5	* n.d.	n.d.
L2	7.5	0.3	0	0	0	0	93		n.d.
F2	20.0	0.8	4	68	8	10	3	n.d.	n.d.
M	275.0	11.0	0	0	0	0	0		30-40
A	537.5	21.5	0	0	0	0	0		150-500

* n.d. — was not determined.

Example 5. Frozen algae *Alaria fistulosa* (25 kg) are prepared for the extraction and extracted as described in Example 1.

The treated algae are dried, covered with 0.1 M solution of hydrochloric acid until a "mirror" is formed, and extracted during 12 hrs at 20—25°C with stirring. The extract is concentrated to 1/5 of the initial volume in an ultrafiltration apparatus provided with a membrane having 5 kDa pores, neutralized to pH 6.0 with a solution of sodium hydroxide, and evaporated in a RE to 1 liter.

Further, the process is carried out as described in Example 1, but the precipitate of polymannuronic acid is dissolved in a minimal volume of 1M solution of ammonium oxalate, neutralized, neutralized, and ammonium polymannuronate (M) is precipitated.

The obtained ammonium polymannuronate preparation comprises a white powder, readily soluble in water and in dimethylsulfoxide; insoluble in alcohol, acetone, hexane and ethyl ether; ash content is 21.0%.

Further, the process is carried out as described in Example 1.

The yield, monosaccharide composition and molecular weight of the polysaccharides from *Alaria fistulosa* are presented in Table 6.

Table 6

Poly-saccharide	Yield		Monosaccharide composition (neutral sugars), %					Fuc/SO ₄ ²⁻ , mole/mole	Mm, KD.
	grams	%	man-nose	fucose	galactose	Xylose	Glucose		
L1	10.0	0.4	0	0	0	0	92		n.d.
F1	44.5	1.8	1	75	6	8	5	n.d.	n.d.
L2	12.5	0.5	0	0	0	0	93		n.d.
F2	0	0							
M	552.5	22.1	0	0	0	0	0		30-40
A	375.3	15.0	0	0	0	0	0		150-500

* n.d. — was not determined.

Example 6. Fresh algae *Undaria pinnatifida* (25 kg) are prepared for the extraction and extracted with ethanol as described in Example 1.

The treated algae are dried, covered with 0.1 M solution of hydrochloric acid until a "mirror" is formed, and extracted during 12 hrs at 20—25°C with stirring. The extract is concentrated to 1/5 of the initial volume in an ultrafiltration apparatus provided with a membrane having 5 kDa pores, neutralized to pH 6.0 with a solution of sodium hydroxide, and evapo-

rated in a rotary evaporator (RE) to 1 liter. Further, the algae are treated as described in Example 1.

The obtained fucoidan preparation (F1 and F2) comprises a white powder, readily soluble in water and in dimethylsulfoxide; insoluble in alcohol, acetone, hexane and ethyl ether; ash content is 30.0%.

Further the process is carried out as described in Example 1, but the precipitate of polymannuronic acid is dissolved in a minimal volume of 1M solution of magnesium hydroxide, neutralized, and magnesium polymannuronate (M) is precipitated.

The obtained magnesium polymannuronate preparation comprises a white powder, readily soluble in water and in dimethylsulfoxide; insoluble in alcohol, acetone, hexane and ethyl ether; ash content is 19.0%.

Further, all the subsequent steps are carried out as described in Example 1, but the alkali treatment of the algae is carried out with 1% solution of magnesium hydroxide, and magnesium alginate (A) is obtained. The obtained magnesium alginate preparation comprises a cream-colored powder, readily soluble in water and in dimethylsulfoxide; insoluble in alcohol, acetone, hexane and ethyl ether; ash content is 20.0%.

The monosaccharide composition and yields of the polysaccharides from *Undaria pinnatifida* are presented in Table 7.

Table 7

Polysaccharide	Yield		Monosaccharide composition (neutral sugars), %				
	grams	%	mannose	fucose	galactose	Xylose	Glucose
L1	0	0	0	0	0	0	0
F1	77.0	3.1	1	44	51	8	0
L2	0	0	0	0	0	0	0
F2	152.0	6.1	0.3	39.5	46.0	0	0.9
M	58.0	2.3	0	0	0	0	0
A	375.3	15.0	0	0	0	0	0

CLAIMS

1. A method for comprehensive processing brown algae to produce preparations for medicinal and cosmetological purposes, consisting in that algae are treated with ethanol, the ethanolic extract is separated, the ethanol is distilled off, and a concentrate of biologically active low-molecular compounds is obtained, then the treated algae are extracted with a solution of diluted hydrochloric acid at pH 2.0—2.5, the extract is concentrated in an ultrafiltration apparatus, neutralized, and a concentrate containing polysaccharide-1 is obtained, comprising a mixture of laminaran and fucoidan, after that fucoidan (F1) and laminaran (L1) are successively precipitated with ethanol, the precipitates are washed with ethanol and dried, then the treated algae are successively extracted twice with hot water at pH 3.5—4.0, the extracts are combined and concentrated in an ultrafiltration apparatus, the concentrate is evaporated, and polysaccharide-2 is obtained, comprising a mixture of laminaran fucoidan and polymannuronic acid, the pH of the extract is adjusted to 2.0—2.5, and the precipitate of polymannuronic acid is separated by centrifugation, the precipitate is dissolved in an alkaline solution, and polymannuronic acid salt (M) is precipitated with ethanol, the precipitate is washed with ethanol and dried, the supernatant is neutralized, and fucoidan (F2) and laminaran (L2) are successively precipitated with ethanol, the precipitates are washed with ethanol and dried, then the algae residue is subjected to alkali treatment at pH 8—9, the extract is concentrated in an ultrafiltration apparatus, neutralized, and polysaccharide-3, comprising alginic acid salt (A), is precipitated with ethanol, the precipitate is washed with ethanol and dried.

2. A method according to claim 1, characterized in that use is made of the algae *Laminaria cichorioides* and/or *Laminaria japonica*, and/or *Alaria marginata*, and/or *Alaria fistulosa*, and/or *Fucus evanescens*, and/or *Undaria pinnatifida*.

3. A method according to claims 1 and 2, characterized in that fresh or frozen algae are used.

4. A method according to claims 1—3, characterized in that the treatment of algae with ethanol is carried out for 20—24 hrs at a temperature of 40—60°C.

5. A method according to claim 1, characterized in that the algae treated with ethanol are dried, the extraction with solution of diluted hydrochloric acid is carried out for 10—14 hrs at a temperature of 20—25°C, and the extraction with hot water is carried out twice for 2—4 hrs and 1—2 hrs, respectively.

6. A method according to claim 1, characterized in that the extracts are successively concentrated in an ultrafiltration apparatus on hollow fibers with membranes having pores of from 5 to 100 kDa.

7. A method according to claim 1, characterized in that for obtaining polymannuronic acid salt, the precipitate of polymannuronic acid is treated with a solution of sodium hydroxide or of ammonium oxalate, or of calcium hydroxide, or of magnesium hydroxide.

8. A method according to claim 1, characterized in that for obtaining alginic acid salt the alkali treatment of algae is carried out with solutions of sodium hydroxide or of ammonium oxalate, or of calcium hydroxide or of magnesium hydroxide during 2—4 hrs at a temperature of 55—65°C.

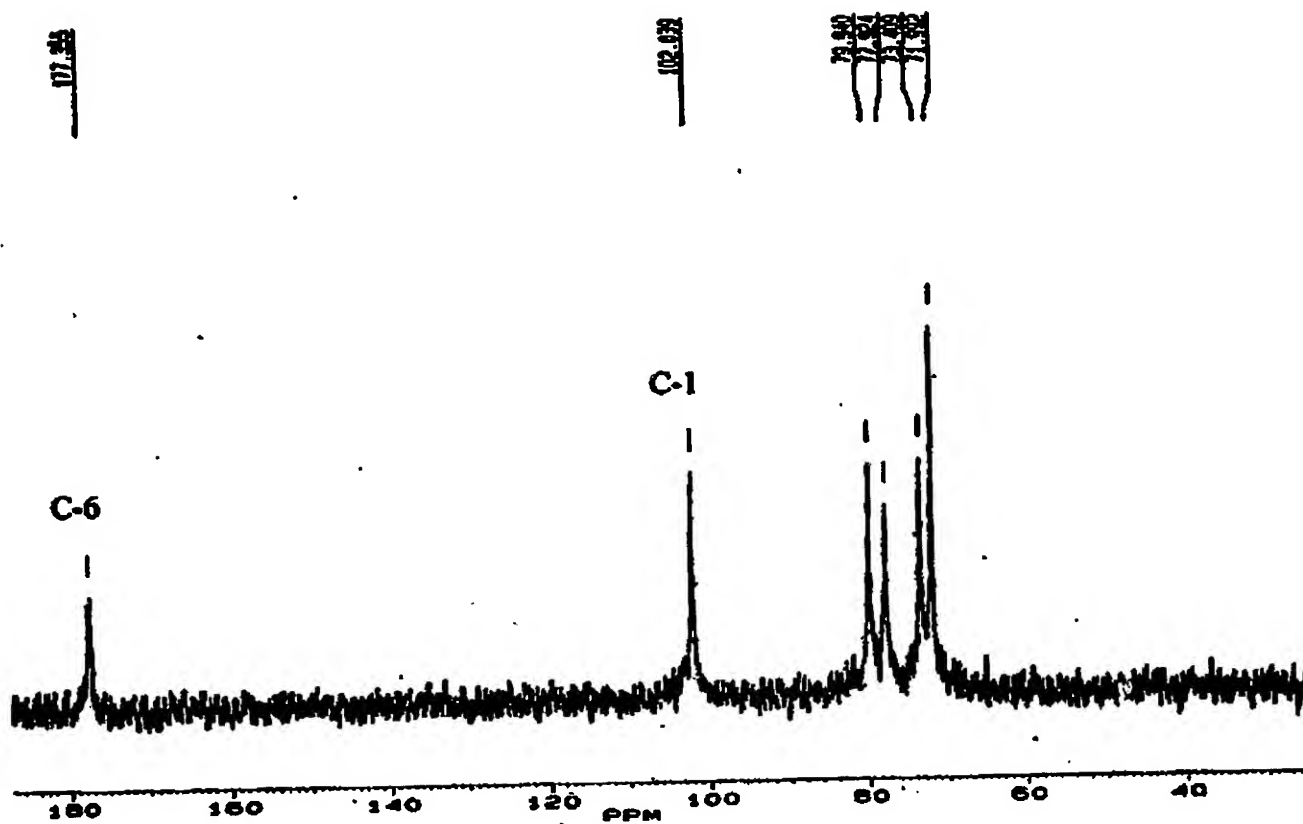


Fig. 1

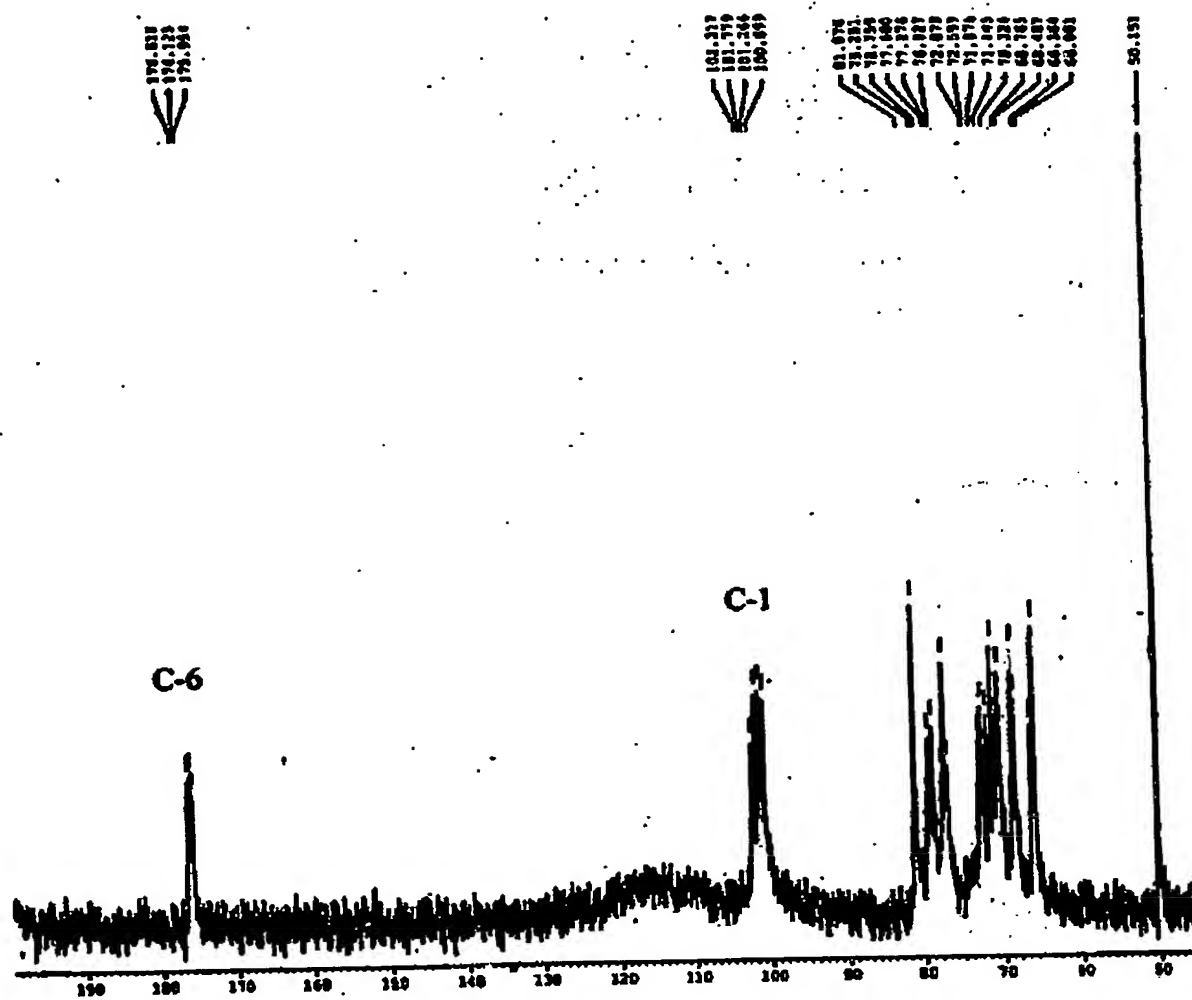


Fig. 2

ABSTRACT

**METHOD FOR COMPREHENSIVE PROCESSING BROWN ALGAE
TO PRODUCE PREPARATIONS FOR MEDICINE AND COSMETOLOGY**

The present invention relates to the technology of comprehensive processing brown algae. Algae are treated with ethanol, the extract is separated, the ethanol is distilled off and a concentrate of biologically active low-molecular compounds is obtained; the treated algae are extracted with a solution of diluted hydrochloric acid at pH 2.0—2.5, the extract is concentrated in an ultrafiltration apparatus, neutralized, evaporated, and a concentrate containing polysaccharide-1 is obtained, comprising a mixture of laminaran and fucoidan; the concentrate is neutralized, and fucoidan (F1) and then laminaran (L1) are successively precipitated with ethanol; the precipitates are washed with ethanol and dried; the treated algae are extracted twice with hot water at pH 3.5—4.0; the extracts are combined and concentrated in an ultrafiltration apparatus, the concentrate is evaporated, and polysaccharide-2 is obtained, comprising a mixture of laminaran, fucoidan and polymannuronic acid; the pH of the extract is adjusted to 2.0—2.5, the precipitate of polymannuronic acid is separated by centrifugation; the precipitate is dissolved in an alkaline solution, and polymannuronic acid salt (M) is precipitated with ethanol, the precipitate is washed with ethanol and dried; the supernatant is neutralized, and fucoidan (F2) and laminaran (L2) are successively precipitated with ethanol, the precipitates are washed with ethanol and dried; the algae residue is subjected to alkali treatment at pH 8—9, the extract is concentrated in an ultrafiltration apparatus, neutralized, and polysaccharide-3, comprising alginic acid salt (A), is precipitated with ethanol, the precipitate is washed with ethanol and dried. The method contemplates using fresh or frozen algae *Laminaria cichorioi-des* and/or *Laminaria japonica*, and/or *Alaria marginata*, and/or *Alaria fistulosa*, and/or *Fucus evanescens*, and/or *Undaria pinnatifida*. The technical result consists in obtaining a complete set of individual polysaccharides.

These preparations have standard characteristics and may find application in medicine as therapeutic agents. A concentrate is also obtained, rich in biologically active low-molecular compounds, which may find application in the perfumery and cosmetic industry. The algae residue after obtaining the concentrate and preparations of polysaccharides may be used as a feed additive.

7 dependent claims, 7 tables, 2 Figures.

Translated by Jibrova A.

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke, located to the right of the text 'Translated by Jibrova A.'.

Российская Федерация, город Москва.
тридцатого сентября две тысячи четвертого года.

Я, Трофименко Екатерина Григорьевна, исполняющая обязанности
нотариуса города Москвы Крылатых Елены Геннадьевны, свидетельствую
подлинность подписи, сделанной переводчиком Жибровой Алисой
Евгеньевной в моем присутствии. Личность ее установлена.

Зарегистрировано в реестре за № 2-6989
Взыскано по тарифу 60 руб.

И.о. нотариуса



Всего прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью 47 лист 2
И.о. нотариуса

